雷公藤总生物碱对粘虫幼虫神经系统酶活性及神经递质含量的影响

周　琳[1,*], 李俊领[1], 刘向阳[1], 马志卿[2], 冯俊涛[2], 张　兴[2]

(1. 河南农业大学植物保护学院, 河南省新型农药创制与应用重点实验室, 郑州 450002;
2. 西北农林科技大学无公害农药研究服务中心, 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】明确雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 生物碱对粘虫 *Mythimna separata* (Walker)神经系统的影响,为阐明其杀虫作用机制提供依据。【方法】采用载毒叶片法测定粘虫 5 龄幼虫经雷公藤总生物碱处理后体内乙酰胆碱酯酶(AChE)、Na^+, K^+-ATPase、Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase、谷丙转氨酶(GPT)和谷氨酸脱羧酶(GAD)等重要神经系统酶活性及乙酰胆碱(ACh)、谷氨酸(Glu)和 γ-氨基丁酸(GABA)等神经递质的含量。【结果】雷公藤总生物碱处理对粘虫 5 龄幼虫 AChE 无明显影响,麻醉期处理粘虫幼虫体内 ACh 相对含量与同期对照无显著差异。处理粘虫幼虫在轻度麻醉期、深度麻醉期和复苏期体内 GABA 和 Glu 含量显著升高,GABA 含量分别升高了 89.86%, 49.28% 和 20.29%,Glu 含量分别升高了 24.55%, 23.33% 和 8.13%。处理粘虫幼虫 GPT 活性明显受到抑制,而 GAD 活性无明显变化。处理明显抑制粘虫幼虫头部 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活性,但对中肠两种 ATPase 活性影响不大。【结论】研究结果有助于了解雷公藤生物碱对昆虫神经系统的影响,也为进一步阐明其作用靶标奠定了基础。

关键词: 粘虫; 雷公藤; 总生物碱; 神经系统酶系; 神经递质

中图分类号: Q965.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2015)08-0856-08

Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae) on the activities of neural enzymes and contents of neurotransmitters in larval *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHOU Lin[1,*], LI Jun-Ling[1], LIU Xiang-Yang[1], MA Zhi-Qing[2], FENG Jun-Tao[2], ZHANG Xing[2] (1. Henan Key Laboratory of Novel Pesticide and Application, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Shaanxi Province, Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】The objective of this research is to determine the effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. on insect nervous system and to provide a basis for elucidating its insecticidal mechanisms.【Methods】The 5th instar larvae of *Mythimna separata* (Walker) were fed with maize leaves treated with the total alkaloids from *T. wilfordii*. The activities of acetylcholine esterase (AChE), Na^+, K^+-ATPase, Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase, glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic decarboxylase (GAD) in the 5th instar larvae of *M. separata* treated were determined at three different poisoning stages, and the contents of neurotransmitters including acetylcholine (ACh), γ-aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) were also assayed.【Results】The AChE activity in the 5th instar larvae of *M. separata* was not affected by the total alkaloids from *T. wilfordii*. The ACh contents in treated larvae in the weak paralysis stage and the deep paralysis stage were not significantly different from those of the corresponding two controls. The GABA contents in treated larvae increased by 89.86%, 49.28% and 20.29%, while the Glu contents increased by 24.55%, 23.33% and 8.13% in the weak paralysis

基金项目: 国家"十五"科技攻关项目(2004BA516A04); 公益性行业(农业)科研专项(200903052); 河南省重点科技攻关项目(082102350033)
作者简介: 周琳, 女, 1971 年生, 河南南阳人, 博士, 教授, 研究方向为生物农药与农药毒理学, E-mail: zhoulinhenau@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhoulinhenau@163.com
收稿日期 Received: 2015-04-09; 接受日期 Accepted: 2015-05-21

stage, the deep paralysis stage and the recovery stage, respectively. The GPT activity in treated larvae was remarkably inhibited by the total alkaloids, but the GAD activity was not affected. The activities of Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase in the brain of treated larvae were inhibited, but those in the midgut did not change. 【Conclusion】The results help us understand the effects of the alkaloids from *T. wilfordii* on insect nervous system, and provide further scientific basis for revealing their action target.

Key words: *Mythimna separata*; *Tripterygium wilfordii*; total alkaloids; neural enzymes; neurotransmitter

从动物、植物和微生物中发现农药活性物质，直接利用其原材料创制新农药或从中寻找先导化合物，对其进行人工合成和修饰合成以开发更高活性化合物，是近年来新农药创制的主要途径。植物在长期生存竞争中为抵御逆境而形成种类繁多的植物次生代谢物质，其中大多数对病、虫、草等有害生物具有一定的生物调控作用。国内外新农药研发实践证明，植物源农药活性物质对有害生物的作用方式新颖，作用机理独特，易于发现新的分子结构及作用靶标(吴文君等, 2008)。雷公藤总生物碱是雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中主要杀虫活性物质，对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等多种昆虫表现出较强的胃毒、拒食、麻醉、生长发育抑制和种群抑制等多种特异性杀虫作用(周琳等, 2006, 2007, 2010)，是一个很有发展潜力的生物碱杀虫剂。周琳等(2008a)优化了从雷公藤根皮中大规模提取杀虫用总生物碱工艺；祝传书等(2013)从雷公藤叶愈伤组织诱导的雷公藤胚状体培养体系中已检测到雷公藤生物碱，为解决其自然资源短缺提供了一条新途径。目前人们已从雷公藤中分离出 6 种杀虫生物碱，均具有卫矛甙骨架(图 1)。

目前关于雷公藤生物碱杀虫作用的研究报道多

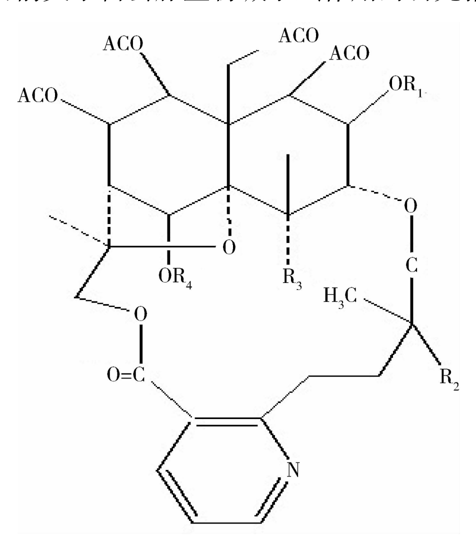


图 1　雷公藤杀虫生物碱的结构通式

Fig. 1　Generic structure of insecticidal alkaloids from *Tripterygium wilfordii*

集中在活性测试上，对其杀虫作用机理的相关研究较少，谭浩(2010)研究了雷公藤总生物碱对昆虫肌质网钙泵的影响，胡兆农等(2008)报道粘虫 *Mythimna separata* (Walker) Na^+, K^+-ATPase 可能是雷公藤定碱和雷公藤次碱的一个重要作用靶标。笔者前期研究了粘虫幼虫取食雷公藤总生物碱后体内几种重要代谢酶系的活性变化(周琳等, 2008b)，症状观察发现粘虫和小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫取食雷公藤总生物碱后均表现为停止取食、麻醉和复苏，复苏试虫可再次取食、麻醉和复苏，如此反复，直至死亡(周琳, 2011)，推测雷公藤生物碱可能作用于昆虫的神经系统。本研究以粘虫 5 龄幼虫为试虫，测试经雷公藤总生物碱处理后试虫体内神经系统酶系的活性及神经递质含量的变化，以明确雷公藤生物碱对昆虫神经系统的影响，为进一步阐明其杀虫作用机理及为雷公藤杀虫剂的科学使用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

粘虫 *M. separata*，由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心养虫室(温度 25 ± 1℃；相对湿度 70% ~80%；光照时间 12L: 12D)提供的室内种群。选择个体大小一致、健康、活泼的 5 龄前期幼虫供试。

1.2　主要药剂

供试药剂为纯度 95% 的雷公藤总生物碱，其提取分离方法参考林绥等(2001)的方法。将采自福建泰宁的雷公藤根皮粉碎过 40 目筛，甲醇室温浸提 4 h，超声提取 20 min。反复 3 次，合并各提取液，减压浓缩得浸膏。浸膏加水后有沉淀物生成，过滤，晾干成粗粉。以 8 倍量质量分数 5% HCl 溶液渗漉该粗粉，渗漉液用浓氨水调至 pH 9 ~ 10，静置 24 h 后过滤，用水洗涤沉淀物 1 次，再滤干，60℃干燥，得粗总生物碱。用乙醚溶解，醚液用质量分数为 1% HCl 溶液萃取，萃取液以氨水调至 pH 9 ~ 10。放置过夜，过滤出沉淀物，用水洗涤 2 次，滤干，60℃干燥，

得白色粉末状总生物碱。以丙酮-甲醇重结晶,得无色颗粒状总生物碱原药,其含量测定采用紫外分光光度法(李琰等, 2009)。

溴化乙酰胆碱、还原型谷胱甘肽、5,5′-二硫双硝基苯甲酸(5, 5′-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)、ATP 钠盐、考马斯亮蓝 G-250 均为 Sigma 公司产品;乌本甘(Ouabain)为 Fluka 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 试虫处理

采用载毒叶片法(刘惠霞等, 2003)。取若干头试虫,饥饿处理 8 h 后,随机分为对照组和处理组。处理组中每头试虫饲喂点涂 1 μL 1 000 mg/L 雷公藤总生物碱的玉米叶碟(0.5 cm×0.5 cm),对照组饲喂点涂 1 μL 丙酮的玉米叶碟(0.5 cm×0.5 cm),一叶 1 虫,单头单皿饲养。取 8 h 内食完整个叶碟的幼虫供试。分别取轻度麻醉期、深度麻醉期、复苏期的中毒试虫(处理试虫)和相应的同期对照试虫进行各项测试。

1.4 乙酰胆碱酯酶(acetylcholine esterase, AChE)活性测定

分别取各中毒期试虫和对照试虫各 20 头,剪取试虫头部(带少量胸部),加入 3 mL 0.2 mol/L pH 7.6磷酸缓冲液冰浴匀浆,所得匀浆液定容至 4.0 mL,0~4℃下以 4 000 r/min 离心 15 min,上清液即为待测酶液。酶活性测定参照 Gorun 等改进的 Ellman 法(高希武, 1987)的方法进行。蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford, 1976)。酶活力以每毫克蛋白每 20 min 水解生成的硫代胆碱的量(μmol/mg pro·20 min)表示。

1.5 乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)含量测定

分别取各中毒期试虫和对照试虫各 50 头,在 0~4℃下剪取头部,分成两份,一份(A)用 0.067 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液匀浆,另一份(B)用含有 0.02 mol/L O,O-二甲基-O-(2,2-二氯乙烯基)磷酸酯的上述缓冲液匀浆,并用各自的缓冲液定容至 2.0 mL,于 850 r/min 冷冻离心 15 min,取上清液待测。ACh 含量测定采用羟胺法(Turner, 1977)。每处理重复 3 次。

1.6 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活体活性测定

分别取各中毒期试虫和对照试虫各 50 头,在 0~4℃下剪取头部,以 1∶9(w/v)加入冰冷的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,冰浴匀浆,在 0~4℃下4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为待测酶液(Feng *et al*., 1992)。同时于 4℃下解剖出中肠(拉掉围食膜),分别按 1∶10(w/v)加入冰冷的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,冰浴匀浆,在 0~4℃ 下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液为待测酶液(Feng *et al*., 1992)。酶活性测定参照冯北元和徐慕禹(1981)、何运转等(1999, 2001)的方法。每处理重复 3 次。以每分钟每毫克蛋白催化产生的磷的量(nmol Pi/mg pro·min)来表示酶比活力。

1.7 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 离体活性测定

取 100 头试虫的头部及中肠,称重后加入 10 倍体积的冰冷的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,冰浴匀浆,在 0~4℃下 4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为待测酶液(Feng *et al*., 1992)。酶活性测定方法同活体活性。每处理重复 3 次。

1.8 谷氨酸(glutamic acid, Glu)和 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)含量测定

采用 Backman 121 型氨基酸分析仪测定。分别取各中毒期试虫和对照试虫各 20 头,分别称重后,加入 80% 乙醇研磨,过滤至蒸发皿中,以 50 mL 80% 乙醇冲洗滤渣,将滤液于 60℃ 恒温水浴中蒸干,然后加入磺基水杨酸沉淀蛋白质,用 Bakeman121MB 型氨基酸分析仪测定 Glu 和 GABA 的含量(以每 100 g 鲜重试虫中含有的毫克数)。每处理重复 3 次。

1.9 谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)活性测定

分别取各中毒期试虫和对照试虫各 20 头,分别称重后,按 1∶3(w/v)加入磷酸缓冲液,冰浴匀浆后于 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液作为待测酶液。参照广东农林科学院蚕桑系(1975)和陈钧辉等(2003)的测定方法。每处理重复 3 次。酶比活力用每毫克蛋白每分钟催化生成的丙酮酸钠的量(nmol/mg pro·min)表示。

1.10 谷氨酸脱羧酶(glutamic decarboxylase, GAD)活性测定

分别取各中毒期试虫和对照试虫各 20 头,按 1∶3(w/v)加入硼酸缓冲液,冰浴匀浆后于 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液待测。酶活性测定参照陈钧辉等(2003)的方法进行。每处理重复 3 次。酶比活力用每分钟每毫克蛋白催化生成的 CO_2 的释放量表示。

1.11 数据统计与分析

实验数据初步使用 Excel 软件进行初期统计分

析，后期采用专业数据统计软件 SPSS (Version 16.0) 中 ANOVA 方法进行方差分析，并用 Tukey 检验比较数据之间的差异显著性。

2　结果

2.1　雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫 AChE 活性与 ACh 含量的影响

从表 1 可以看出，雷公藤总生物碱处理试虫在轻度麻醉期的 AChE 活力较同期对照有所升高，但差异不显著；深度麻醉期和复苏期处理试虫 AChE 经 Tukey 检验与同期对照相比无显著差异。可见，雷公藤总生物碱对粘虫 AChE 无明显的抑制或激活作用，可初步判断 AChE 不是雷公藤总生物碱对试虫的主要作用靶标。

由表 1 还可知，处理试虫在麻醉期体内 ACh 的相对含量与同期对照无显著差异；复苏期 Ach 含量则显著低于对照。但分析 ACh 相对含量的变化不足以导致其神经传导的受阻。

2.2　雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 活体活性的影响

2.2.1　对中毒试虫头部 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 活性的影响：由表 2 可以看出，粘虫 5 龄幼虫经雷公藤总生物碱处理后，头部 Na^+，K^+-ATPase 比活力在各中毒期均显著低于同期对照，表明供试药剂可明显抑制试虫头部 Na^+，K^+-ATPase 活性，轻度麻醉期、深度麻醉期和复苏期的酶抑制率分别为 27.79%，36.46% 和 22.83%。

从表 2 还可看出，中毒试虫在轻度麻醉期、深度麻醉期和复苏期，其头部 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 活性均显著低于相应对照，抑制率分别为 14.82%，36.63% 和 32.94%。

表 1　雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫 AChE 活性和 ACh 含量的影响

Table 1　Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* on AChE activity and ACh content in the 5th instar larvae of *Mythimna separata*

取样时期 Sampling period	乙酰胆碱酯酶(AChE)活性 AChE activity			乙酰胆碱(ACh)相对含量 ACh content		
	处理 Treatment (μmol/mg pro · 20 min)	对照 Control (μmol/mg pro · 20 min)	比值 Ratio (Tr/CK)	处理 Treatment (μmol/mL)	对照 Control (μmol/mL)	比值 Ratio (Tr/CK)
轻度麻醉期 Week paralysis stage	0.231 ± 0.006 a	0.218 ± 0.004 a	1.06	0.286 ± 0.002 a	0.290 ± 0.003 a	0.99
深度麻醉期 Deep paralysis stage	0.214 ± 0.005 a	0.221 ± 0.005 a	0.97	0.293 ± 0.003 a	0.289 ± 0.002 a	1.01
复苏期 Recovery stage	0.203 ± 0.007 a	0.216 ± 0.005 a	0.94	0.268 ± 0.005 b	0.285 ± 0.005 a	0.94

谷胱甘肽含量标准曲线 The regression equation of GSH content：$Y = -0.003238 + 3.766300X$ ($r = 0.9999$)；蛋白质含量标准曲线 The regression equation of protein content：$Y = 0.026400 + 0.002373X$ ($r = 0.9918$)；Ach 含量标准曲线 The regression equation of Ach content：$Y = -0.000392 + 0.145853X$ ($r = 0.9999$)。表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差；表中同一指标同行数据标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$，Tukey 检验)；表中对照为与处理试虫相对应的同期未经药剂处理试虫。下表同。Data in the table are given by mean ± *SD* from 3 duplications and those of the same parameter within a row followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$, by Tukey's test). Controls in the table mean untreated insects with the total alkaloids in the same sampling period as treated insects. The same for the following tables.

表 2　雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫头部 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 活性的影响

Table 2　Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* on Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activities in the brain of the 5th instar larvae of *Mythimna separata*

取样时期 Sampling period	Na^+，K^+-ATPase 活性 Na^+，K^+-ATPase activity			Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 活性 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase activity		
	处理 Treatment (μmol/mg pro · 20 min)	对照 Control (μmol/mg pro · 20 min)	抑制率(%) Inhibition rate	处理 Treatment (μmol/mg pro · 20 min)	对照 Control (μmol/mg pro · 20 min)	抑制率(%) Inhibition rate
轻度麻醉期 Weak paralysis stage	0.297 ± 0.011 b	0.411 ± 0.010 a	27.79	0.274 ± 0.016 b	0.321 ± 0.017 a	14.82
深度麻醉期 Deep paralysis stage	0.265 ± 0.005 c	0.417 ± 0.015 a	36.46	0.204 ± 0.011 b	0.323 ± 0.007 a	36.63
复苏期 Recovery stage	0.320 ± 0.036 b	0.415 ± 0.005 a	22.83	0.221 ± 0.006 b	0.329 ± 0.010 a	32.94

磷含量标准曲线 The regression equation of phosphorus content：$Y = 0.003771 + 20.198400X$ ($r = 0.9997$)；蛋白质含量标准曲线 The regression equation of protein：$Y = 0.248800 + 1.18500 \times 10^{-3}X$ ($r = 0.9940$)。表 3 同 The same for Table 3.

2.2.2 对中毒试虫中肠 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 的影响：由表 3 可知，中毒试虫 Na^+, K^+-ATP 酶比活力在轻度麻醉期与同期对照无显著差异，而深度麻醉期和复苏期均显著低于同期对照，酶抑制率分别为 2.02%，10.77% 和 16.12%。由表 3 还可以看出，Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 比活力只有在深度麻醉期显著低于同期对照，酶抑制率为 20.45%，而其他中毒期处理试虫酶比活力与相应对照无差异。

表 3 雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫中肠 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活性的影响

Table 3 Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* on Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activities in the midgut of the 5th instar larvae of *Mythimna separata*

取样时期 Sampling period	Na^+, K^+-ATPase 活性 Na^+, K^+-ATPase activity			Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活性 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activity		
	处理 Treatment (μmol/mg pro·20 min)	对照 Control (μmol/mg pro·20 min)	抑制率 (%) Inhibition rate	处理 Treatment (μmol/mg pro·20 min)	对照 Control (μmol/mg pro·20 min)	抑制率 (%) Inhibition rate
轻度麻醉期 Weak paralysis stage	0.264 ±0.015 a	0.270 ±0.016 a	2.02	0.256 ±0.007 b	0.295 ±0.030 a	13.46
深度麻醉期 Deep paralysis stage	0.239 ±0.005 b	0.268 ±0.007 a	10.77	0.236 ±0.009 b	0.297 ±0.013 a	20.45
复苏期 Recovery stage	0.226 ±0.010 b	0.270 ±0.009 a	16.12	0.268 ±0.015 a	0.301 ±0.019 a	10.89

2.3 雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 离体活性的影响

测定了 250，500，1 000，2 000 和 4 000 μg/mL 5 个不同剂量的雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫头部和中肠 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 离体活性的影响，结果表明，雷公藤总生物碱对试虫头部和中肠的两种 ATP 酶均无明显的抑制或激活作用。

2.4 雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫 Glu 和 GABA 含量的影响

由表 4 可看出，粘虫 5 龄幼虫在不同中毒期，体内 Glu 和 GABA 含量明显高于其同期对照，表明雷公藤总生物碱对这 2 种神经递质含量有显著影响。在轻度麻醉期、深度麻醉期和复苏期，处理幼虫体内 GABA 含量分别升高 89.86%，49.28% 和 20.29%，Glu 含量分别升高 24.55%，23.33% 和 8.13%。

表 4 雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫体内谷氨酸和 γ-氨基丁酸含量的影响

Table 4 Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* on GABA and Glu contents in the 5th instar larvae of *Mythimna separata*

取样时期 Sampling period	谷氨酸含量 Glu content (mg/100 g)			γ-氨基丁酸含量 GABA content (mg/100 g)		
	处理 Treatment	对照 Control	比值 Ratio (Tr/CK)	处理 Treatment	对照 Control	比值 Ratio (Tr/CK)
轻度麻醉期 Weak paralysis stage	37.69 ±1.52 a	30.26 ±1.17 c	1.25	1.31 ±0.02 a	0.69 ±0.03 d	1.90
深度麻醉期 Deep paralysis stage	37.32 ±0.40 a	30.26 ±1.17 c	1.23	1.03 ±0.02 b	0.69 ±0.03 d	1.49
复苏期 Recovery stage	32.72 ±0.82 b	30.26 ±1.16 c	1.08	0.83 ±0.01 c	0.69 ±0.03 d	1.20

2.5 雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫 GPT 和 GAD 活性的影响

由表 5 可以看出，试虫各中毒期的 GPT 比活力均显著小于同期对照，表明雷公藤总生物碱对中毒试虫体内 GPT 活性有明显的抑制作用，轻度麻醉期、深度麻醉期和复苏期的酶抑制率分别为 30.54%，33.27% 和 35.15%。不同中毒期处理幼虫体内 GAD 比活力与同期对照相比无显著差异，表明雷公藤总生物碱对粘虫 GAD 活性无影响（表 5）。

3 讨论与结论

粘虫幼虫取食雷公藤总生物碱后的症状学观察表明其作用于昆虫神经系统，但其作用机制有别于

表 5　雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫谷丙转氨酶和谷氨酸脱羧酶活性的影响

Table 5　Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* on glutamate-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic decarboxylase (GAD) activities in the 5th instar larvae of *Mythimna separata*

取样时期 Sampling period	谷丙转氨酶活性 GPT activity			谷氨酸脱羧酶活性 GAD activity		
	处理 Treatment (nmol/mg pro・min)	对照 Control (nmol/mg pro・min)	抑制率(%) Inhibition rate	处理 Treatment (μL/mg pro・min)	对照 Control (μL/mg pro・min)	比值 Ratio (Tr/CK)
轻度麻醉期 Weak paralysis stage	7.73 ±0.19 b	11.12 ±0.80 a	30.54	5.42 ±0.26 ab	5.28 ±0.16 ab	1.03
深度麻醉期 Deep paralysis stage	7.39 ±0.02 b	11.08 ±0.31 a	33.27	4.92 ±0.32 b	5.23 ±0.16 ab	0.94
复苏期 Recovery stage	7.20 ±0.04 b	11.10 ±0.11 a	35.15	5.65 ±0.42 a	5.32 ±0.16 ab	1.06

传统的神经毒剂(周琳, 2011)。本研究发现雷公藤总生物碱对中毒试虫体内 AChE 活性无明显影响，这与中毒试虫没有出现有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂那样明显的兴奋症状也是相吻合的。这些研究均初步表明 AChE 不是雷公藤总生物碱的主要作用靶标。并且分析中毒试虫神经递质 ACh 含量的变化不足以影响甚至阻断神经冲动的传导而出现软瘫麻痹。六六六作用于昆虫中枢神经的突触前膜,促进 ACh 的释放,导致 ACh 含量显著升高;巴丹作用于昆虫突触后膜上的乙酰胆碱受体,阻断了接受 ACh 的功能,ACh 含量也明显升高,而本实验测定中毒试虫体内 ACh 含量无明显变化,这进一步表明雷公藤总生物碱不象六六六和巴丹那样作用于神经突触。由此可初步判断,乙酰胆碱激性突触不是雷公藤总生物碱的作用部位。

前期通过症状学观察推测雷公藤总生物碱可能象阿维菌素一样作用于昆虫的神经-肌肉接点,致使兴奋性传导被阻断,试虫表现出肌肉松弛、虫体软瘫等症状。在昆虫中,Glu 和 GABA 都是神经-肌肉突触部位的神经递质,Glu 是兴奋性递质,其作用和脊椎动物的 ACh 相同,与其受体结合后能产生兴奋性突触后电位。其在 GAD 的作用下灭活而生成 GABA,而 GABA 是抑制性递质,作用和 ACh 相反,与其受体结合后能产生抑制性突触后电位(刘惠霞等, 1998)。正常情况下,神经传导是依赖兴奋性突触和抑制性突触的精确平衡来协调。Glu 和 GABA 的含量发生变化,即会影响正常的神经传导,从而使机体表现中毒症状。本研究中麻醉试虫体内 Glu 含量显著升高,这与同科南蛇藤属植物扶芳藤根部麻醉成分使麻醉粘虫体内 Glu 含量升高的毒理学研究结果相似(任志刚等, 1998);马志卿等(2003)报道阿维菌素致麻痹粘虫体内 Glu 含量也是升高的,这说明突触前膜兴奋性神经递质的减少可能不是麻醉的真正原因。本实验测定结果表明,中毒试虫 GABA 含量显著升高,且随中毒程度的加深而升高,这可能是雷公藤总生物碱致中毒试虫麻醉的一个重要原因。进一步分析,如果药剂作用于昆虫神经-肌肉突触后膜(肌细胞膜)上的 GABA 受体,诱导受体构象改变,使 Cl^- 离子通道开放,Cl^- 迅速涌入膜内,使膜超极化,从而使动作电位不能产生,神经系统的正常动作电位传导受到破坏,试虫即表现出行动迟缓、麻醉症状。那么肌细胞膜上的 GABA 受体是否是雷公藤生物碱导致昆虫麻醉的真正靶标,尚有待通过电生理等技术进一步研究证实。

Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 不但存在于昆虫的神经系统中,在中肠、肌肉等活动比较强烈的组织或器官中均大量存在。神经系统中 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 可影响轴突运输、神经递质的释放及神经质膜的稳定性;此外,在神经细胞内还有许多被 Ca^{2+} 活化的受体,如钙调蛋白(CaM)、肌钙蛋白 C 和钙调素(冷欣夫等, 1996)。Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活性若被抑制,必然会影响细胞膜上离子通道的开放或关闭,使细胞膜两侧离子平衡和渗透平衡失常,继而导致神经系统功能紊乱,最终使昆虫死亡。宁黔冀和尚稚珍(1996)、Leng 等(1995)、何运转等(1999)以及 Matsumura 和 Ghiasuddin(1979)报道拟除虫菊酯类杀虫剂对不同昆虫中枢神经系统 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活力均有较强的抑制作用,Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 是拟除虫菊酯类杀虫剂的靶标位点之一。本研究结果表明,雷公藤总生物碱也能显著抑制粘虫活体 Na^+, K^+-ATPase 和 Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活性,这种抑制作用最终会严重影响机体细胞的代谢生长,破

坏其神经细胞的传导功能，从而使试虫表现出特异行为，如拒食、麻醉、生长发育抑制等。但雷公藤总生物碱在离体条件下不能抑制 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 的活性，这说明在活体条件下 2 种 ATPase 被显著抑制可能是雷公藤总生物碱对神经系统影响的后效应。

雷公藤总生物碱对粘虫幼虫乙酰胆碱酯酶(AChE)活性无明显影响；麻醉期粘虫幼虫体内 ACh 的相对含量与同期对照无显著差异。中毒试虫在轻度麻醉期、深度麻醉期和复苏期，体内 GABA 和 Glu 含量显著升高；雷公藤总生物碱可明显抑制粘虫幼虫谷丙转氨酶(GPT)的活性，对谷氨酸脱羧酶(GAD)活性无明显影响。雷公藤总生物碱可明显抑制粘虫幼虫头部 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 活性，但对中肠两种 ATPase 活性影响不大。通过分析可知，乙酰胆碱激性突触不是雷公藤总生物碱的作用部位；昆虫的神经-肌肉接点可能是雷公藤总生物碱的作用部位之一；雷公藤总生物碱对粘虫体内 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATPase 的影响可能是其对神经系统影响的后效应。

参考文献(References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

Chen JH, Tao L, Li J, Zhu WH, Yuan YS, 2003. Biochemistry Experiments. 3rd ed. Science Press, Beijing. 88-100. [陈钧辉, 陶力, 李俊, 朱婉华, 袁玉荪, 2003. 生物化学实验(第 3 版). 北京: 科学出版社. 88-100]

Department of Sericulture and Silk, Guangdong Academy of Agricultural and Forestry Sciences, 1975. Effect of juvenile hormone analogs on the activities of glutamic acid-pyruvic acid transaminase in the posterior portion of silk grand in *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 18(4): 363-366. [广东农林科学院蚕桑系, 1975. 昆虫保幼激素类似物对家蚕后部丝腺谷氨酸-丙酮酸转氨酶活性的影响. 昆虫学报, 18(4): 363-366]

Feng BY, Xu MY, 1981. A sensitive method for determining the activity of Na^+, K^+-ATPase of synaptosomes in mouse brain. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 8(2): 48-49. [冯北元, 徐慕禹, 1981. 大鼠脑突触体 Na-K-ATPase 活力的微量测定方法. 生物化学与生物物理进展, 8(2): 48-49]

Feng GL, Jacques RM, Clark JM, 1992. Suppression of pyrethroid-dependent neurotransmitter release from synaptosomes of knockdown-resistant house flies under pulsed-depolarization conditions during continuous perfusion. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 42(1): 64-77.

Gao XW, 1987. Introduction of Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations modified by Gorun. *Entomological Knowledge*, 24(4): 245-246. [高希武, 1987. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 24(4): 245-246]

He YZ, Li M, Feng GL, Wang YC, 1999. Inhibition of pyrethroid insecticides on nerve Na^+, K^+-ATPase in house flies (*Musca domestica*). *Acta Entomologica Sinica*, 42(1): 19-24. [何运转, 李梅, 冯国蕾, 王荫长, 1999. 拟除虫菊酯对家蝇 Na^+, K^+-ATPase 抑制作用的研究. 昆虫学报, 42(1): 19-24]

He YZ, Li M, He FQ, Feng GL, Wang YC, 2001. Inhibition of pyrethroid insecticides on nerve Ca-ATPase, Ca-Mg-ATPase in house flies (*Musca domestica*). *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 297-303. [何运转, 李梅, 何凤琴, 冯国蕾, 王荫长, 2001. 拟除虫菊酯对家蝇 Ca-ATPase 和 Ca-Mg-ATPase 的抑制作用. 昆虫学报, 44(3): 297-303]

Hu ZN, Cheng D, Dai YL, Shi BJ, 2008. Contact action of wilfordine and wilforine from *Tripterygium hypoglaucum* and their effects on Na^+-K^+-ATPase activities of *Mythimna separata*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 10(1): 75-79. [胡兆农, 程丹, 戴亚丽, 师宝君, 2008. 昆明山海棠杀虫活性成分雷公藤定碱和雷公藤次碱的触杀作用及对 Na^+-K^+-ATP 酶活性的影响. 农药学学报, 10(1): 75-79]

Leng XF, Tang ZH, Wang YC, 1996. Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance. China Agriculture Press, Beijing. 7-8. [冷欣夫, 唐振华, 王荫长, 1996. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性. 北京: 中国农业出版社. 7-8]

Leng XF, Xiao DQ, 1995. Effect of deltamethrin on protein phosphorylation of housefly brain synaptosomes. *Pesticide Science*, 44(1): 88-89.

Li Y, Feng JT, Shi XY, Wu YY, Zhang X, 2009. Study on the determination of triptolide and total alkaloids in *Tripterygium wilfordii* Hook. f. cultures. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 11(3): 367-372. [李琰, 冯俊涛, 史晓燕, 吴勇延, 张兴, 2009. 雷公藤组培产物中雷公藤甲素和总生物碱含量的测定. 农药学学报, 11(3): 367-372]

Lin S, Li YC, Sakurai N, Lin JF, Jin JJ, 2001. Study of sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 36(2): 116-119. [林绥, 李援朝, 樱井信子, 林建峰, 金静君, 2001. 雷公藤倍半萜生物碱的研究. 药学学报, 36(2): 116-119]

Liu HX, Li XG, Wu WJ, 1998. Entomology Biochemistry. Shaanxi Science and Technology Press, Xi'an. 223-225. [刘惠霞, 李新岗, 吴文君, 1998. 昆虫生物化学. 西安: 陕西科学技术出版社. 223-225]

Liu HX, Yang CJ, Lian XH, Wu WJ, 2003. Effects of celangulin V on muscle cells of *Mythimna separata*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(4): 417-423. [刘惠霞, 杨从军, 廉喜红, 吴文君, 2003. 苦皮藤素 V 对东方粘虫肌细胞的影响. 昆虫学报, 46(4): 417-423]

Ma ZQ, Chen AL, Feng JT, Li GZ, Zhang X, 2003. The bioactivity comparison between abamectin and fipronil against armyworm, *Mythimna separata*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 5(4): 37-41. [马志卿, 陈安良, 冯俊涛, 李广泽, 张兴, 2003. 阿维菌素和氟虫腈对粘虫的毒杀作用比较. 农药学学报, 5(4): 37-41]

Matsumura F, Ghiasuddin SM, 1979 Characteristics of DDT-sensitive Ca-ATPase in the axonic membrane. In: Toshio N ed. Neurotoxicology of Insecticides and Pheromones. Plenum Press, New York. 245 – 257.

Ning QJ, Shang ZZ, 1996. Measurement and Application of Insect ATPase Activity. In: Zhang ZL, Piao YF, Wu JW eds. Proceedings on Integrated Pest Management in China. China Agriculture Press, Beijing. 1068 – 1071. [宁黔冀, 尚稚珍, 1996. 昆虫 ATPase 活性的测定与应用. 见: 张芝利, 朴永范, 吴钜文 主编. 中国有害生物综合治理论文集. 北京: 中国农业科技出版社. 1068 – 1071]

Ren ZG, Liu HX, Wu WJ, 1998. Primary toxicological studies on narcosis components from the roots of *Euonymus fortunei*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 5(7): 1 – 3. [任志刚, 刘惠霞, 吴文君, 1998. 扶芳藤根部麻醉成分的初步毒理学研究. 西北农业学报, 5(7): 1 – 3]

Tan H, 2010. Effects of Alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. on Calcium Pump of *Sarcoplasmic reticulum* in Insects. MSc Thesis, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi. [谭浩, 2010. 雷公藤生物碱对昆虫肌质网钙泵的影响. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]

Turner PB, 1977. Analytical Biochemistry of Insects. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.

Wu WJ, Liu HX, Hu ZN, Ji ZQ, Zhang JW, Qi ZJ, Lian XH, Shi BJ, Lv M, 2008. Advances in research of insecticidal plant *Celastrus angulatus*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(6): 845 – 851. [吴文君, 刘惠霞, 胡兆农, 姬志勤, 张继文, 祁志军, 廉喜红, 师宝君, 吕敏, 2008. 从天然产物到新农药创制——杀虫植物苦皮藤研究进展. 昆虫知识, 45(6): 845 – 851]

Zhou L, 2011. Toxicity of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook against *Mythimna separata* (Walker) and its effects of on AChE and Ach. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 26(1): 215 – 218. [周琳, 2011. 雷公藤总生物碱对粘虫幼虫的毒力及对乙酰胆碱酯酶和乙酰胆碱的影响. 华北农学报, 26(1): 215 – 218]

Zhou L, Feng JT, Ma ZQ, Zhang X, 2006. Insecticidal activity of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook against *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Phytophylacica Sinica*, 33(4): 401 – 406. [周琳, 冯俊涛, 马志卿, 张兴, 2006. 雷公藤总生物碱对粘虫的生物活性. 植物保护学报, 33(4): 401 – 406]

Zhou L, Feng JT, Ma ZQ, Zhang X, 2008a. Optimum technology for extracting total alkaloid from an insecticidal plant *Tripterygium wilfordii* Hook with ethanol. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 24(12): 287 – 290. [周琳, 冯俊涛, 马志卿, 张兴, 2008a. 雷公藤提取农药用总生物碱的工艺优化. 农业工程学报, 24(12): 287 – 290]

Zhou L, Feng JT, Zhang JT, Ma ZQ, Zhang X, 2007. Bioactivity of the total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook against several important pests. *Plant Protection*, 33(6): 60 – 63. [周琳, 冯俊涛, 张锦恬, 马志卿, 张兴, 2007. 雷公藤总生物碱对几种昆虫的生物活性. 植物保护, 33(6): 60 – 63]

Zhou L, Ma ZQ, Feng JT, Zhang X, 2010. Population inhibition of the total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. *Chinese Journal of Biological Control*, 26(1): 106 – 109. [周琳, 马志卿, 冯俊涛, 张兴, 2010. 雷公藤总生物碱对玉米象和赤拟谷盗的种群抑制作用. 中国生物防治, 26 (1): 106 – 109]

Zhou L, Ma ZQ, Feng JT, Zhang X, 2008b. Effects of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. on the growth and development of *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) and its metabolic enzymes. *Acta Entomologica Sinica*, 51(11): 1151 – 1156. [周琳, 马志卿, 冯俊涛, 张兴, 2008b. 雷公藤总生物碱对粘虫生长发育及几种代谢酶系的影响. 昆虫学报, 51(11): 1151 – 1156]

Zhu CS, Feng HN, Xue LS, Yang GL, Feng JT, Zhang X, 2013. Preliminary study on triptolide and total alkaloid production of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. embryoid culture. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 21(6): 631 – 640. [祝传书, 冯慧娜, 薛璐莎, 杨广隶, 冯俊涛, 张兴, 2013. 雷公藤胚状体培养合成雷公藤甲素与总生物碱的初步研究. 农业生物技术学报, 21 (6): 631 – 640]

（责任编辑：赵利辉）